

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

JPA03-164200

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **03164200 A**(43) Date of publication of application: **16.07.91**

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68(21) Application number: **01303166**(22) Date of filing: **24.11.89**(71) Applicant: **HITACHI LTD**(72) Inventor:
FUJITA MASAHIKO
KANBARA HIDEKI
MURAKAWA KATSUJI
NAGAI KEIICHI
SHIMADA TAMOTSU**(54) ANALYSIS OF GENE BY LIQUID HYBRIDIZATION****(57) Abstract:**

PURPOSE: To detect the presence of a specific base sequence and the mutation of base pair and to analyze a gene by adding a specific nucleoside triphosphate, a DNA fragment and a DNA polymerase to a specimen containing nucleic acid to synthesize a complementary strand DNA and analyzing the DNA by gel electrophoresis.

CONSTITUTION: Four kinds of nucleoside triphosphates, a DNA fragment having a specific sequence and a DNA

polymerase are added to a DNA specimen containing nucleic acid of an organism or virus and subjected to hybridization. The synthesized complementary strand DNA is analyzed by gel-electrophoresis to analyze the gene by the base length pattern of the DNA. In the above process, the hybridization is carried out by using a non-labeled oligonucleotide terminator in combination with a labeled oligonucleotide primer and a DNA sequence between both components is synthesized to enable the analysis of gene using liquid hybridization technique.

COPYRIGHT: (C)1991,JPO&Japio

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

平3-164200

⑮ Int. Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 平成3年(1991)7月16日

C 12 Q 1/68

A

6807-4B

審査請求 未請求 請求項の数 3 (全8頁)

⑭ 発明の名称 液体ハイブリダイゼーションによる遺伝子の分析方法

⑰ 特 願 平1-303166

⑱ 出 願 平1(1989)11月24日

⑲ 発 明 者 藤 田 雅 彦 東京都国分寺市東恋ヶ窪 1 丁目 280 番地 株式会社日立製作所基礎研究所内

⑲ 発 明 者 神 原 秀 記 東京都国分寺市東恋ヶ窪 1 丁目 280 番地 株式会社日立製作所基礎研究所内

⑲ 発 明 者 村 川 克 二 東京都国分寺市東恋ヶ窪 1 丁目 280 番地 株式会社日立製作所中央研究所内

⑲ 発 明 者 永 井 啓 一 東京都国分寺市東恋ヶ窪 1 丁目 280 番地 株式会社日立製作所中央研究所内

⑳ 出 願 人 株式会社日立製作所 東京都千代田区神田駿河台 4 丁目 6 番地

㉑ 代 理 人 弁理士 平木 祐輔 外 1 名

最終頁に続く

明 細 書

1. 発明の名称

液体ハイブリダイゼーションによる遺伝子の分析方法

2. 特許請求の範囲

1. 生物又はウイルスの核酸を含む DNA 試料に 4 種類のヌクレオシドトリフォスフェート、特定配列の DNA 断片及び DNA ポリメラーゼを加えハイブリダイゼーションさせ、相補鎖 DNA を合成し、得られる合成 DNA をゲル電気泳動にかけてその塩基長パターンにより遺伝子を分析する方法であって、上記ハイブリダイゼーションを標識オリゴヌクレオチドプライマーと共に非標識オリゴヌクレオチドターミネーターを使用し、前記オリゴヌクレオチドプライマーと前記オリゴヌクレオチドターミネーターの間の DNA 配列を合成して行うことを特徴とする液体ハイブリダイゼーションによる遺伝子の分析方法。

2. 生物又はウイルスの核酸を含む DNA 試料に

4 種類のヌクレオシドトリフォスフェート、特定配列の DNA 断片及び DNA ポリメラーゼを加えハイブリダイゼーションさせ、相補鎖 DNA を合成し、この相補鎖 DNA を変性させた後再びハイブリダイゼーションさせるハイブリダイゼーション及び変性を複数回くり返して、前記相補鎖 DNA を増幅し、得られる増幅した DNA をゲル電気泳動にかけてその塩基長パターンにより遺伝子を分析する方法であって、上記ハイブリダイゼーションを標識オリゴヌクレオチドプライマーと共に非標識オリゴヌクレオチドターミネーターを使用し、前記オリゴヌクレオチドプライマーと前記オリゴヌクレオチドターミネーターとの間の領域の DNA 配列を増幅せしめることを特徴とする液体ハイブリダイゼーションによる遺伝子の分析方法。

3. 4 種類のヌクレオシドトリフォスフェート、DNA ポリメラーゼ、標識オリゴヌクレオチドプライマー及び非標識オリゴヌクレオチドターミネーターを含む液体ハイブリダイゼーションによ

る遺伝子の分析用試薬。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、1または複数の生物またはウイルスからの核酸を含有するサンプルにおいて特定の核酸配列の有無、該核酸配列中の塩基対の欠失あるいは挿入、もしくは変異を検出して遺伝子を分析する方法及び該分析用試薬に関する。

(従来の技術)

従来の遺伝子分析方法としては、サイエンティフィックアメリカン18巻4号(1988年)に記載されているPFLP(restriction-fragment length polymorphism)法が知られている。

この方法は、分析しようとする染色体DNA等を制限酵素で切断後、電気泳動にかけるもので、制限酵素の認識部位に塩基対の欠失、挿入あるいは変異があれば、得られる制限フラグメントの長さが変わり、制限フラグメントの多型(restriction fragment length polymorphism)として現れる。これを電気泳動後、サザンブロッティングにより、

の存在、非存在を確認するものである。

(発明が解決しようとする課題)

上記の従来技術のうち、PFLP法では、制限酵素認識部位が全染色体DNA中に広く分布していることにより、全染色体を対象にして解析できるので、広い範囲の遺伝子情報を得ることが可能であり、このため、例えば犯罪捜査等における個人識別、あるいは遺伝子病やウイルス感染症の診断には有効であるが、制限酵素の種類が限られているため、サンプルDNA中の制限酵素により認識できる塩基配列も限られていた。したがって、前記個人識別あるいは遺伝子病やウイルス感染症の診断のため、マーカーとして有効な塩基配列があったとしても、これを識別する制限酵素がなければこの方法を適用することができず、この方法の適用例は限られていた。

また、PCR法においては、一回の増幅反応で検出しようとする特定の核酸配列を 10^3 倍程度に増幅できるので、検出が容易であるという長所がある反面、上記核酸配列の各単鎖に相補するプライ

マーズを用いて検出するものである。

また、他の方法としては、特開昭62-217161号に記載されているPCR(Polymerase Chain Reaction)法が知られている。この方法は2本鎖DNAの各単鎖と各々相補する2種類のプライマーを使用し、特定の核酸配列部位を増幅してウイルス等の検出を行うものである。

すなわち、まず、サンプル中の2本鎖DNAを加熱変性させ、単鎖の各DNAに分離させる。次いで2種類のプライマーを準備し、各単鎖のDNAにハイブリダイズさせ、DNAポリメラーゼを作用せしめて各プライマーから延長鎖を生成せしめる。

さらに得られた2本鎖の延長生成物に対し、上記の操作を複数回繰り返すことにより、上記2本鎖DNAにおける各プライマー間にはさまれ、かつ検出しようとする領域を有するDNA断片を増幅して得ることができる。

以下、標識プローブあるいは制限酵素を使用して上記DNA断片の有無を検出して、ウイルス等

の存在、非存在を確認するものである。

マーズを2種類使用するほか更にプローブあるいは制限酵素を用いて検出するため上記核酸配列のかかりの部分が明らかになっていなければならない、またこのため解析できる遺伝子の種類も限られ、狭い範囲の遺伝子情報しか得ることができなかった。

さらに、上記PFLP法及びPCR法とも検出においては、わざわざ標識プローブ等を調製して使用しなければならない、分析操作も簡便なものとはいえないものであった。

本発明の課題は、これら従来技術の問題点を解決することにより、取り扱える遺伝子情報の範囲が広く、かつ個人識別あるいは遺伝病やウイルス感染症の診断に汎用的に適用できるとともにその操作を簡便に行いうる遺伝子の分析方法を提供することにある。

(課題を解決するための手段)

本発明者等は、上記課題を解決するために鋭意研究の結果、予め標識したオリゴヌクレオチドプライマーと延長反応を停止させるための非標識オ

リボスクレオチドターミネータを用いて分析対象遺伝子DNAを鋳型として該プライマーから延長されターミネータに至る上記DNAと相補のDNA群を合成し、該合成されたDNA群を電気泳動にかけそのパターンを鑑察する方法を見出し、本発明を完成するに至ったものである。

すなわち本発明は、

1. 生物又はウイルスの核酸を含むDNA試料に4種類のヌクレオシドトリフォスフェート、特定配列のDNA断片及びDNAポリメラーゼを加えハイブリダイゼーションさせ、相補鎖DNAを合成し、得られる合成DNAをゲル電気泳動にかけてその塩基長パターンにより遺伝子を分析する方法であって、上記ハイブリダイゼーションを標識オリゴヌクレオチドプライマーと共に非標識オリゴヌクレオチドターミネーターを使用し、前記オリゴヌクレオチドプライマーと前記オリゴヌクレオチドターミネーターの間のDNA配列を合成して行うことを特徴とする液体ハイブリダイゼーションによる遺伝子の分

イマー及び非標識オリゴヌクレオチドターミネーターを含む液体ハイブリダイゼーションによる遺伝子の分析用試薬。

に関するものである。

以下、本発明を更に詳述する。

本発明の上記第1の方法を第2図に基づき説明する。

まず、サンプルDNAを加熱変性させ、単鎖のDNA6を生成せしめる。次いで、DNA6中の検出しようとする領域の5'末端側の塩基配列と相補する予め標識されたオリゴヌクレオチドプライマー4と同領域の3'末端側の塩基配列と相補する非標識のオリゴヌクレオチドターミネータ5を準備し、これらを上記単鎖のDNA6とハイブリダイズさせる。

このとき、dATP、dCTP、dGTP、dTTPからなる4種のDNA構成成分とDNAポリメラーゼを存在させると、DNA6を鋳型とし、上記標識オリゴヌクレオチドプライマー4の3'末端側からDNA合成が開始され、オリゴヌクレオチドターミネー

タ方法。

2. 生物又はウイルスの核酸を含むDNA試料に4種類のヌクレオシドトリフォスフェート、特定配列のDNA断片及びDNAポリメラーゼを加えハイブリダイゼーションさせ、相補鎖DNAを合成し、この相補鎖DNAを変性させた後再びハイブリダイゼーションさせるハイブリダイゼーション及び変性を複数回くり返して、前記相補鎖DNAを増幅し、得られる増幅したDNAをゲル電気泳動にかけてその塩基長パターンによる遺伝子を分析する方法であって上記ハイブリダイゼーションを標識オリゴヌクレオチドプライマーと共に非標識オリゴヌクレオチドターミネーターを使用し、前記オリゴヌクレオチドプライマーと前記オリゴヌクレオチドターミネーターとの間の領域のDNA配列を増幅せしめることを特徴とする液体ハイブリダイゼーションによる遺伝子の分析方法。
3. 4種類のヌクレオシドトリフォスフェート、DNAポリメラーゼ、標識オリゴヌクレオチドプラ

タ5の直前まで延長される。図中破線で示された部分が合成された部分である。

次に、電気泳動にかければ検出しようとする領域を含むDNAの断片のパターンをみることができる。

この場合、上記標識オリゴヌクレオチドプライマーは、プローブとしても機能するものであり、もし、上記電気泳動において、DNA断片を検出し得ない場合は、特定の塩基配列がないかあるいは、プライマー4に対する付着部位の塩基配列の変異を示し、また、DNA断片の長さが異なって観測される場合には、DNA6におけるプライマー4とターミネータ5の間の領域に相当する塩基配列の挿入欠失変異かあるいは、ターミネータ5に対する付着部位の塩基配列の変異を示している。

さらに本発明の第2の方法について第4図に基づいて説明する。

この第2の方法はサンプルDNAが微量な場合、検出しようとする特定の塩基配列を有するDNA断片を増幅して検出するものであり、まず、標識

されたオリゴヌクレオチドプライマー4と非標識オリゴヌクレオチドターミネータ5、及び4種のDNA構成核酸成分とDNAポリメラーゼを用いてDNA6及びDNA6と相補鎖を形成した一方のDNA6'を鋳型とするDNA合成を行う。

この場合、ターミネータ5はDNA6'とハイブリダイズし、またDNA6'を鋳型し、プライマーとして機能できるように塩基配列を調製する。

この操作より、DNA6を鋳型として標識プライマー4の3'末端側から延長鎖が合成され、ターミネータ5と相補のターミネータ配列5'まで延長される(a鎖)。一方、ターミネータ5は標識プライマーとしても機能し、DNA6'を鋳型としてターミネータ5の3'末端側から延長鎖が合成される(b鎖)(第4図(1))。

次に、上記と同様の標識プライマー、ターミネータ及び4種のDNA構成核酸成分とDNAポリメラーゼの存在下、上記操作により生成した相補鎖を加熱変性して単鎖に分離し、これら各単鎖を鋳型としてDNAを合成せしめる。

ない。

オリゴヌクレオチドプライマーを標識するマーカーとしては、常法の分析において使用するものが用いられ、例えば蛍光色素、放射性物質あるいは酵素等を挙げることができる。

本発明に用いるDNAポリメラーゼとしては、例えばタックポリメラーゼ(由来;サーマス・アクアティカス)、クレノウフラグメント(由来;大腸菌)、シーケナーゼ(由来;T7ファージ)等を挙げることができる。

次に、本発明における2本鎖DNAを加熱変性させ、単鎖のDNAを得る条件としては、94℃、3分間が適当である。

本発明におけるサンプルDNAとオリゴヌクレオチドプライマー及びオリゴヌクレオチドターミネータとのハイブリダイゼーションは特に液体ハイブリダイゼーションを行う点で従来の方法に比して特異的である。

なお、以上の説明は分析する対象がDNAの場合について行ったが、レトロウイルス等のRNA

この操作により検出しようとする(a)鎖はDNA6及び(b)鎖からも合成され増幅する(第4図(2))。

さらに以上の操作を複数回反復すれば標識されかつ検出しようとするDNA断片を増幅して得ることができる。

以下、これを前記と同様に電気泳動にかけることによりサンプルDNAが微量な場合であっても充分分析することが可能となる。

本発明において用いるオリゴヌクレオチドプライマー及びオリゴヌクレオチドターミネータは、分析しようとする遺伝子DNAに合わせて、適宜任意調製して使用するものであり、プライマー及びターミネータとして機能しうるものであれば特に限定されるものではなく、またその調製に際しては通常行われているDNA合成機等を用いて行えば良い。

その塩基対数としては、オリゴヌクレオチドプライマーの場合、10~15bpが好適であり、またオリゴヌクレオチドターミネータの場合は4~8bpが好適であるが、これも特に限定されるわけでは

の場合であっても、これを鋳型としてDNAを合成することにより、本発明の方法が適用できることはいうまでもない。

また本発明の上記方法において使用する上記4種類のヌクレオチドフォスフェート、DNAポリメラーゼ、標識オリゴヌクレオチドプライマー及び非標識オリゴヌクレオチドターミネータは、こらを含有する分析用試薬として使用できる。この分析用試薬は、分析対象のサンプルDNAと接触せしめ、変性条件及びハイブリダイゼーションの条件を付与することにより検出しようとするDNA群を合成し得るものであり、簡便に個人識別、遺伝子病あるいはウイルス感染症の診断に利用できる。

(作 用)

本発明の第一の方法においては予め標識したオリゴヌクレオチドプライマーと非標識オリゴヌクレオチドターミネータがハイブリダイズされ、次いでプライマーを起点として相補鎖合成断片が生成され前記ターミネータの手前まで延長される。

これがゲル電気泳動において観測され、また第二の方法においては、プライマーにはさまれた領域が増幅され、標識プライマーからの延長生成物のみがゲル電気泳動により観測される。

上記いずれの方法においても塩基長分布パターンは個人あるいは感染症の原因となる生物またはウイルスにより大きく異なるので、個人識別、遺伝病や感染症の診断が容易になる。また第二の方法においてはDNAサンプルが微量のときでも充分検出できる。

(発明の効果)

本発明の方法において最も特徴的なことは、予め標識したオリゴヌクレオチドプライマーと非標識オリゴヌクレオチドターミネータを用いる点にあり、これにより全染色体DNAを解析対象とすることが可能となるほか、疾病遺伝子とリンケージするマーカーとして有効な塩基配列があった場合においては、オリゴヌクレオチドプライマーとターミネータの配列を任意に調節すれば該塩基配列をマーカーとして利用することが可能となり、

識別、遺伝子病、ウイルス感染病等の診断のみならず遺伝子操作を伴う技術分野全般に亘って貢献するものである。

(実施例)

以下、本発明の実施例を個人識別の二例を用いて説明する。

実施例1

解析したヒトのDNAはManiatisの方法(Molecular Cloning 280-281 (1982))に従って2人のヒトの血液から抽出した。100 μ gの上記ゲノムDNA(核DNAコピー数は 10^7 ヶのオーダー)を10mM Tris-HCl(pH7.5)、50mM KCl、2.5mM MgCl₂、100 μ g/mlゼラチン、0.1 μ Mのオリゴヌクレオチドプライマーとオリゴヌクレオチドターミネータ(本発明では非標識オリゴヌクレオチドとターミネータとして用いるのでこう称した)、0.5mM dATP、0.5mM dCTP、0.5mM dGTP、0.5mM dTTPを含む初期体積100 μ lの水溶液に希釈した。これに40 μ lの鉱油を重ねた後、98℃で10分間加熱してゲノムDNAを変性し次いで50℃に冷却し

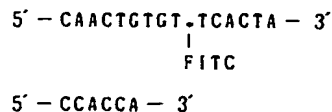
この点において、マーカーとして有効な塩基配列があったとしてもこれを識別する制限酵素がない場合には適用し得ない従来のPFLP法に比べて有利性があり、遺伝子病あるいはウイルス感染症の診断等において極めて重要な効果を有するものである。また、プローブとしても機能する標識されたプライマー及び塩基対数の少ないターミネータを用いることにより、2種類のプライマーに加えて更にプローブあるいは制限酵素を用いて行う従来のPCR法に比べて塩基配列の解明がそれほど進んでいない遺伝子の検出にも適用できるという利点も有している。

更に本発明のオリゴヌクレオチドプライマーは予め標識されており、プローブとしても機能し得るので従来法におけるように新たにプローブを調製しうることなくしかも単に電気泳動により観察しようとするDNA断片群のパターンをみることができ点で極めて簡便である。

以上の効果を有する本発明は極めて画期的な遺伝子分析方法であって、犯罪捜査等における個人

た。ここに、サーマス・アクアティカスからの2 μ lのポリメラーゼを添加し、このDNAサンプルにつき次の温度変化を与えた。

- (1) 3分間の94℃での加熱
 - (2) オリゴヌクレオチドプライマーとオリゴヌクレオチドターミネータをハイブリダイズするために50℃への冷却と3分間の50℃での保温
 - (3) プライマー延長生成物を生ぜしめるための70℃への加熱と70℃での10分間の保温
- 合成反応に用いたオリゴヌクレオチドプライマーは蛍光色素FITC(フルオレセイン イソチオシアネート)で標識したものを用い、オリゴヌクレオチドターミネータは非標識でその配列は次のとおりとした。



以上の反応の結果、得られたDNA断片を2%

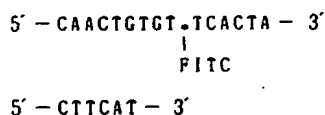
ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動分離し、Arレーザを用いて蛍光色素FITCを励起してDNA断片群から発光する蛍光を実時間で検出したところ第1図に示すDNA断片スペクトルが得られた。縦軸は蛍光強度、横軸はDNA断片群がArレーザ照射域を通過する時間である。

ゲノム DNA に蛍光標識プライマーとハイブリダイズする箇所が複数あるので DNA 断片群が複数に観測された。第 1 図に示したように DNA 断片 1 及び 3 の長さの相異、並びに個人 B における DNA 断片 2 の欠失から観測された。DNA 断片の長さの相異は第 2 図に示したプライマー 4 とターミネータ 5 の間の挿入欠失変異かターミネータ 5 付着部位の塩基配列の変異に由来し、DNA 断片の有無は標識プライマー 4 付着部位の塩基配列の変異に由来する。このように本実施例においてはゲノム DNA 全体に渡って点変異及び挿入欠失変異に由来する DNA の多型を検出できる。

本実施例はサンプルDNAが充分量供給されている場合に有効で、ゲノムDNAの多くの部位に

(3) プライマー延長生成物を生ぜしめるための
70℃への加熱と70℃での2分間の保温

最終サイクル後、サンプルを72℃でさらに10分間インキュベートして最終延長反応を完結させた。増幅反応に用いたオリゴヌクレオチドプライマーは蛍光色素FITC(フルオレセイン イソチオシアネート)で標識したものを用い、オリゴヌクレオチドターミネータは非標識でその配列は次のとおりであった。



以上の反応の結果得られた DNA 断片を 3 % ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動分離し、Arレーザを用いて DNA 断片群からの蛍光をリアルタイムで検出したところ第 3 図に示す DNA 断片スペクトルが得られた。第 3 図に示したように DNA 断片 7 の有無、並びに DNA 断片 8 の長さの相異が観測された。DNA 断片の有無は標識プライマ

ついて分析できるという特長がある。

实施例 2

ヒト DNA は Higuchi らの方法 (Nature vol. 332 No. 7 (1988 年)) に従って 2 人の毛髪から抽出した。0.1 μ g の上記ゲノム DNA (核 DNA コピー数は 10^4 程度のオーダー) を 10mM Tris-HCl (pH 7.5)、50mM KCl、2.5mM MgCl₂、100 μ g/ml ゼラチン、0.5 μ M のオリゴスクレオチドプライマーとオリゴスクレオチドターミネータ、1.5mM dATP、1.5mM dCTP、1.5mM dGTP、1.5mM dTTP を含有する初期体積 100 μ l の水溶液に希釈した。これに 40 μ l の鉱油を重層した後、98℃で10分間加熱してゲノム DNA を変性し、次いで 50℃に冷却した。ここにサーマス・アクアティカスからの 2 μ l のポリメラーゼを添加し、次の熱サイクルを 25 回繰り返した。

(1) 3 分間の94℃の加熱

(2) プライマーとターミネータをハイブリダイズするための50℃への冷却と3分間で50℃での保温

ー 9 付着部位の塩基配列の変異に由来し、DNA断片の長さの相異はプライマー 9 とプライマー 10 の間の挿入欠失変異がプライマー 10 付着部位の塩基配列の変異に由来する。以上のように微量の DNA についても、実施例 1 と同様にゲノム DNA 全体に渡って点変異及び挿入欠失変異に由来する DNA の多型を検出できた。

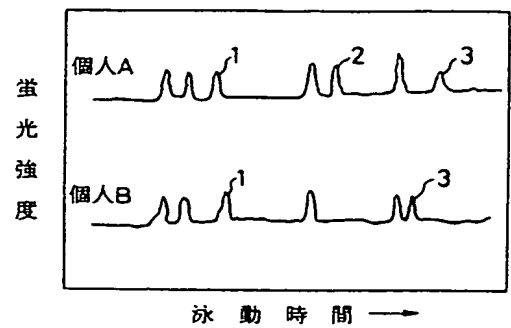
4. 図面の簡単な説明

第1図は本発明の実施例1による分析結果図、
第2図は実施例1のDNA合成・停止法の原理図、
第3図は本発明の実施例2による分析結果図、第
4図は実施例2のDNA増幅の原理図である。

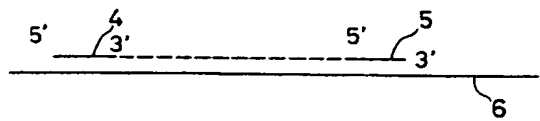
4, 9…標識オリゴヌクレオチドプライマー、
5, 10…非標識オリゴヌクレオチドターミネータ、
6, 11…ゲノム鋳型DNA。

出願人 株式会社日立製作所
代理人 弁理士 平 木 祐 輔
同 弁理士 石 井 貞 次

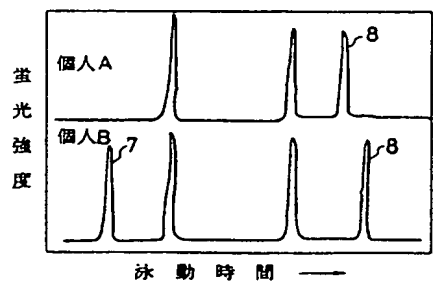
第 1 図



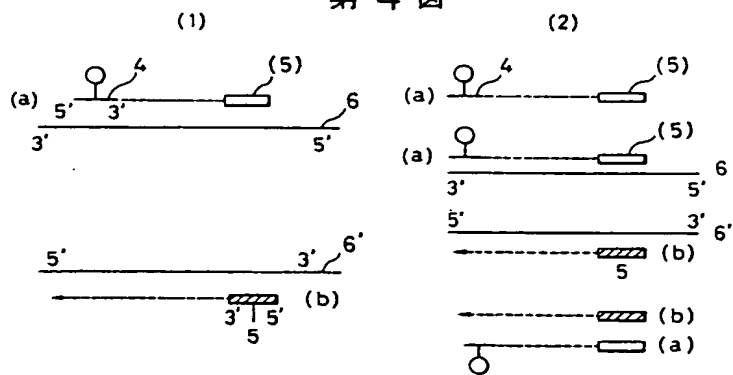
第 2 図



第 3 図



第 4 図



第1頁の続き

⑦発明者

嶋田

保

東京都国分寺市東恋ヶ窪1丁目280番地 株式会社日立製作所中央研究所内

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.